ОГЛАВЛЕНИЕ

1	СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МАРКИРОВКИ КОМПОНЕНТОВ НАБОРА	3
2	НАЗНАЧЕНИЕ	4
3	ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА	4
4	АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	5
5	КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА	5
6	МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
7	ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЙ	8
	7.1Проведение ПЦР	6
	7.2Анализ результатов	7
8	ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ	10
9	УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ	10
10	ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ	10

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МАРКИРОВКИ КОМПОНЕНТОВ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Изделие медицинское для диагностики in vitro
	Ограничение температуры
	Использовать до……
	Дата изготовления
	Код партии
	Максимальное число тестов
	Обратитесь к руководству по эксплуатации
	Производитель
	Номер по каталогу
	Порядковый номер
	Дата изменения
	Не допускать попадания солнечного света

2 НАЗНАЧЕНИЕ НАБОРА

Набор реагентов «COVID-19-скрин» предназначен для выявления генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 в клиническом материале пациентов с симптомами острого респираторного заболевания методом ПЦР в режиме реального времени.

Материалом для исследования являются назофарингиальные мазки, сыворотка крови, а также материал, полученный postmortem от пациентов с симптомами респираторной инфекцией.

3 ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

3.1 Принцип метода

Набор реагентов «COVID-19-скрин» позволяет проводить выявление участка гена E SARS-CoV-2.

Исследования основаны на технологии ПЦР в режиме реального времени с использованием реакции обратной транскрипции (ОТ - реакция) для перевода РНК в комплементарную ДНК (кДНК), реакции (ПЦР) для амплификации специфических последовательностей-мишеней и целевых специфических зондов для обнаружения амплифицированной кДНК. В смесь для амплификации введены зонды, меченные разными флуоресцентными метками, что позволяет раздельно регистрировать результаты амплификации кДНК вируса и внутреннего контрольного образца.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

В качестве отрицательного контрольного образца этапа амплификации (К-) используется ТЕ-буфер. Появление флуоресцентного сигнала в отрицательном контроле свидетельствует о наличии контаминации реактивов или образцов.

В качестве положительного контроля этапа амплификации используется образец, содержащий генно-инженерную конструкцию, включающую участок гена - мишени гена E SARS-CoV-2. Отсутствие положительного сигнала в пробе с положительным контролем ПЦР может свидетельствовать об ошибках, допущенных на этапе постановки ПЦР, либо нарушении условий хранения реагентов набора.

3.2 Состав набора

Состав набора реагентов для проведения ПЦР - амплификации в режиме реального времени для выявления РНК SARS-CoV-2 представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Состав набора реагентов для выявления РНК SARS-CoV-2 методом ПЦР в режиме реального времени

№	Реактив	Описание	Объем, мл	Количество
1	ПЦР-смесь FRP SARS-CoV-2/ END	Прозрачная бесцветная жидкость	0,5	2 пробирки
2	ПЦР - смесь RT - mix	Прозрачная бесцветная жидкость	0,25	2 пробирки
3	ПКО SARS-CoV-2/ END	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка
4	Полимераза Tag (HF)	Прозрачная бесцветная жидкость	0,06	1 пробирка
5	ТЕ - буфер	Прозрачная бесцветная жидкость	0,1	1 пробирка

3.3 Комплектность

Набор реагентов «COVID-19-скрин» рассчитан на проведение 100 исследований, включая контроли

4 АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

4.1 Специфичность анализа

Набор реагентов позволяет обнаружить генетический материал SARS-CoV-2. Показано отсутствие неспецифических реакций компонентов набора в отношении других вирусов.

4.2 Аналитическая чувствительность не менее $1x10^3$ГЭ/мл.

4.3 Аналитическая специфичность не менее 98%

4.4 Диагностическая чувствительность не менее 98%

4.5 Воспроизводимость100%

5 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

В соответствии с системой менеджмента качества, каждая партия каждого комплекта проверяется на основании заранее определенных спецификаций для обеспечения постоянного качества продукции.

6 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Работа должна проводиться в лаборатории, выполняющей молекулярно-биологические (ПЦР) исследования клинического материала на наличие возбудителей инфекционных болезней с соблюдением Санитарных норм и правил «Требования безопасности при осуществлении работ с условно-патогенными микроорганизмами и патогенными биологическими агентами, к организации и проведению их учета, хранения, передачи и транспортировки», утвержденные постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 6 января 2017 г. № 2.

Убирать и дезинфицировать разлитые образцы или реактивы, используя дезинфицирующие средства в соответствии Санитарные нормы и правила «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами», утвержденные

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 7 февраля 2018 г. №14.

ВНИМАНИЕ! Для снижения риска контаминации продуктами ПЦР лабораторной зоны, оборудования и реагентов при утилизации пробирок, содержащих продукты ПЦР запрещается открывание пробирок и разбрызгивание содержимого.

7 ПРОВЕДЕНИЕ ПЦР-ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение ПЦР исследования включает следующие этапы:

- экстракция РНК из исследуемых образцов;
- проведение реакции обратной транскрипции;
- проведение амплификации с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» и интерпретация результатов.

Для работы следует использовать только наконечники и пластиковые пробирки с маркировкой «RNase-free, DNase-free».

Для экстракции РНК и получения кДНК рекомендуется использовать наборы реагентов, производства РНПЦ эпидемиологии и микробиологии: комплект реагентов для выделения ДНК/РНК «НуклеСорб» (ТУ BY 100558032.305 -2015), комплект реагентов для постановки реакции обратной транскрипции РНК «РЕВЕРТАЗА - M-MuLV-50» (ТУ BY 100558032.306 – 2015);

7.1 Проведение ПЦР

При работе на приборе Rotor-Gene 3000, Rotor-Gene 6000 и Rotor-Gene Q должны использоваться с прозрачным дном ПЦР - пробирки объемом 0,2 мл или 0,1 мл (детекция проводится через дно пробирки). Для работы на приборе CFX96 (Bio-Rad, США) используются ПЦР - пробирки объемом 0,2 мл с прозрачной крышкой (детекция сигнала через крышку пробирки) или 96-ти луночные планшеты для ПЦР совместимые с данным прибором.

Этапы проведения ПЦР представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Этапы проведения ПЦР

Этапы	№п/п	Проведение ПЦР
Подготовка реакционной смеси	1	Разморозить необходимое количество пробирок с **ПЦР-смесь FRP SARS-CoV-2/ END**, с **ПЦР-смесью RT-mix** и с **полимеразой Tag(HF)**.
	2	Перемешать содержимое пробирок с ПЦР-смесью FRP SARS-CoV-2/ END, ПЦР-смесью RT-mix и полимеразой Tag (HF) и осадить капли кратковременным центрифугированием на вортексе.
	3	Отобрать и промаркировать необходимое количество пробирок объемом 0,2 мл для амплификации кДНК контрольных проб с учетом постановки необходимых контролей реакции.
	4	Подготовить реакционную смесь для проведения n реакций: смешать в отдельной пробирке **10x(N+1) мкл ПЦР-смесь FRP** соответствующего наименования **5x(N+1) мкл RT-mix** и **0,5x (N+1) мкл полимеразы Tag(HF),** где (N+1) – количество анализируемых образцов с учетом «К+» и «К-» (N) с запасом на 1 образец.
	5	Внести в каждую пробирку объемом 0,2 мл **по 15 мкл** приготовленной реакционной смеси и внести **10 мкл анализируемого образца** в соответствии с маркировкой пробирок.
Контроль проведения реакции	6	В пробирки для проведения контрольных реакций внести: **(К-)** - внести в пробирку**10 мкл ТЕ-буфер**; **(К+)** - внести в пробирку **10 мкл ПКО** соответствующего наименования; **(ОК)** - внести в пробирку **10 мкл** пробы, выделенной из **ОКО**.
Программирование прибора	7	Запрограммировать приборы для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала как указано в таблице 3

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Таблица 3 - Программа амплификации для программирования соответствующих приборов

Rotor-Gene 3000, 6000, Rotor-Gene Q, CFX96				
Этап	Температура, C°	Продолжительность этапа	Измерение Флуоресценции	Количество циклов
Hold/Удержание температуры	95	5 мин		1
Cycling 1/ Циклирование	95	10с	Без детекции флуоресценции	10
	58	20с		
	72	10с		
Cycling 2/ Циклирование	95	10с		35
	58	20с	Детекция флуоресценции по каналам FAM/Green,ROX/Orange	
	72	10с		

Установить пробирки с реакционной смесью и анализируемыми образцами в ячейки реакционного модуля прибора. Запустить выполнение программы амплификации с детекцией флуоресцентного сигнала. По окончании выполнения программы приступить к анализу и интерпретации результатов.

7.2 Анализ результатов

Анализ результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Результаты амплификации анализируют по двум каналам, на основании наличия пересечения кривой флуоресценции на каждом из каналов с установленной на соответствующем уровне пороговой линией. Наличие (или отсутствие) в данной пробе кДНК определяет значения порогового цикла «Ct» в соответствующей графе. Наименования каналов, по которым происходит детекция генетического материала коронавируса SARS-CoV-2 и эндогенного внутреннего контроля приведены таблице 4.

Таблица 4 - Наименования каналов, по которым происходит детекция

Наименование ПЦР-смесь FRP	**Детекции по каналу**	
	FAM/Green	**Rox/Orange**
ПЦР-смесь FRP SARS-CoV-2	ПКО EDG	коронавирус SARS-CoV-2

Этапы анализа результатов ПЦР на приборах «Rotor-Gene» представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Этапы анализа результатов ПЦР

Этапы	№ п/п	Анализ результатов
Выбор каналов для анализа	1	Выбрав меню **Analysis**, щёлкните дважды по кнопке **Quantitation (Количественный Анализ)** или нажмите кнопки **Quantitation** или **Show (Показать)**, чтобы открыть анализ данных интересующего канала **(FAM/Green, JOE/Yellow/Hex, Rox/Orange).**
Удаление выбросов	2	В открывшемся окне выберите кнопку **Outlier Removal (Удаление Выбросов)** установите значение **10%.**
Расчет значений CT	3	В меню **CT-Calculation (Расчет значений CT)** установите значение **CT 0,1** для каждого образца.

ПЦР смесь FRP	**Канал**	**Threshold / Порог**	**More Settings / Outlier Removal / Устранение выбросов**	**Slope Correct / Коррект. уклона**
SARS-CoV-2	FAM/Green	0,1	10	Не использовать
	Rox/Orange	0,1	10	Не использовать

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Этапы анализа результатов ПЦР на приборе CFX96 представлены в таблице 6.

Этапы	№ п/п	Анализ результатов
Выбор каналов для анализа	1	Выбрать один флуорофор закладки **Quantitation (Количественный Анализ),** выбрав кнопку-флажок с названием флуорофора под графиком амплификаци.
Регулировка пороговой линии	2	Выберете **Settings > Baseline Threshold** в строке меню для открытия окна Baseline Threshold
	3	Отрегулируйте пересекающий уровень для флуорофора, щелкнув на User Defined (Определяемый пользователем) и наберите значение порогового цикла Для канала **FAM** на уровне 20%, для канала ROX – на уровне 10% от максимального уровня флуоресценции образцов ПКО в последнем цикле амплификации.

7.2.1 Интерпретация результатов

Таблица 7 - Значение порогового цикла «Ct» для детекции коронавируса SARS-CoV-2

Наименование ПЦР-смесь FRP	**Детекция результатов на амплификаторе Rotor-Gene 3000, 6000, Rotor-Gene Q, CFX96**	
	Значение порогового цикла «Ct»	
	FAM/Green	**Rox/Orange**
	Детекция ПКО EDG	Детекция SARS-CoV-2
ПЦР-смесь FRP SARS-CoV-2	2≤28	≤28

Результат исследования методом ПЦР считается достоверным, если получены результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации, указанные в таблице 8.

Таблица 8 - Результаты для положительных и отрицательных контролей амплификации

Контроль	Контролируемый этап ПЦР-анализа	Значение порогового цикла «Ct»	
		FAM/Green	**Rox/Orange**
«ОК»	Экстракция РНК/ДНК	Отсутствует	Отсутствует
«К-»	ПЦР	Отсутствует	Отсутствует
Для соответствующего ПКО			
SARS-CoV-2/END	ПЦР	<28	<28

Интерпретация результатов по выявлению SARS-CoV-2:

- результат положительный:

РНК SARS-CoV-2 обнаружена, если для данного образца определено значение порогового цикла «Ct» по каналам **Rox/Orange** и **FAM/Green** и кривые флуоресценции для данного образца пересекают пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции по соответствующему каналу. Значения пороговых циклов не должны превышать значения указанные в таблице 7.

- результат отрицательный:

РНК SARS-CoV-2 не обнаружена, если для данного образца не определено значение порогового цикла «Ct»по каналу **Rox/Orange**, кривая флуоресценции данного образца не пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции. Для данного образца **по каналу FAM/Green** должно быть определено значение порогового цикла и кривая флуоресценции пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

- результат сомнительный:

Результат анализа считается сомнительным, если для данного образца не определено (и/или превышает) значение порогового цикла «Ct» по каналу **FAM/Green**. В этом случае

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

требуется повторно провести исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции РНК. Если при повторном исследовании образца не определено (и/или превышает) значение порогового цикла «Ct» по каналу **FAM/Green** образец считать отрицательным.

В случае, когда по каналу **Rox/Orange** определено значение порогового цикла превышающее значения, указанные в таблице 7, а значения для канала **FAM/Green** не превышают допустимые значения, требуется повторно провести исследование соответствующего клинического образца, начиная с этапа экстракции РНК. При повторении результата образец считать сомнительным.

ВНИМАНИЕ! Все сомнительные образцы должны быть направлены в национальную референс-лабораторию для подтверждающего тестирования.

8 ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

8.1 Транспортировка набора должна производиться в закрытых транспортных средствах или контейнерах по ГОСТ 20435 всеми видами транспорта по группе 5 ОЖ4 ГОСТ 15150 при температурах, соответствующим условиям хранения комплектов реагентов, входящих в состав набора.

8.2 Срок годности набора – 12 месяцев со дня приемки ОТК изготовителя.

8.3 Набор с истекшим сроком годности применению не подлежит.

8.4 Набор реагентов следует хранить при температуре минус 20°С в течение всего срока годности.

8.5 Набор реагентов перед первым применение разукомплектовать в соответствии с указанными температурами хранения и далее хранить ПЦР-смесь FRP и полимеразу Taq (HF) при температуре минус 20°С; положительные контрольные образцы и ТЕ -буфер при температуре от плюс 2 до плюс 8°С.

9 УКАЗАНИЯ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ

Набор должен использоваться согласно Инструкции по применению, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

10 ГАРАНТИИ ИЗГОТОВИТЕЛЯ

10.1 Изготовитель гарантирует соответствие набора заявленным параметрам при соблюдении потребителем условий транспортирования и хранения, установленных настоящими ТУ. При нарушении условий транспортировки специфическая активность компонентов набора может снизиться. Рекламации на качество направлять на предприятие-изготовитель по адресу: 220114, Минск, ул. Филимонова, 23, РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, тел. 237-62-95.

10.2 Изготовитель сохраняет за собой право изменять или модифицировать продукт в целях улучшения его применения и дизайна.

Регистрация МИ в Росздравнадзоре
www.nevacert.ru | info@nevacert.ru